

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-021636

(43)Date of publication of application : 24.01.2003

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
C12M 1/00
C12Q 1/68
G01N 13/10
G01N 13/16
G01N 37/00
// C12N 15/09
G01B 21/20
G01N 33/543
G01N 33/58

(21)Application number : 2001-207128

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 06.07.2001

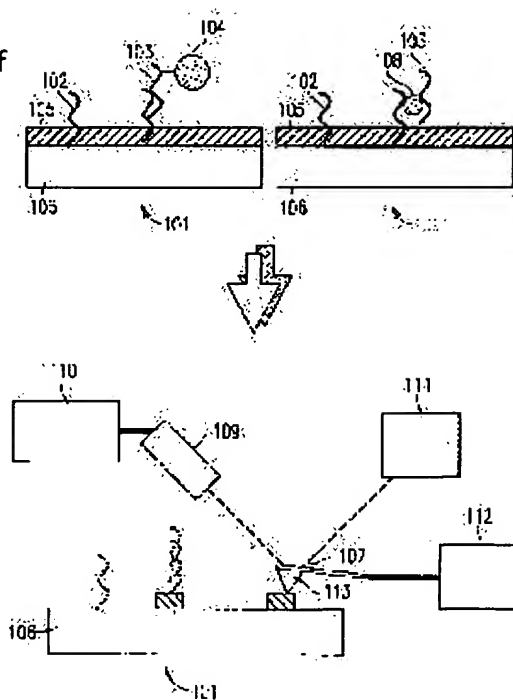
(72)Inventor : OZAKI NOBUHIKO
OKA HIROAKI
YUKIMASA TETSUO
SUGIHARA HIROKAZU

(54) SENSOR WITH CHANGEABLE SURFACE GEOMETRY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method capable of dense accumulation of analyte in a solution and capable of simplified yet highly sensitive detection of the analyte, a device usable for this purpose, and an apparatus equipped with such a device.

SOLUTION: The analyte measuring method contains a process for capturing the analyte at one or more regions on the substrate, a process for altering the geometry of the capturing region of the analyte, and a process for detecting the geometrical alteration to detect the presence of the analyte. The process of geometrical alteration is accomplished by supplying energy to the capturing region in the presence of a labelling substance that specifically connects to the analyte captured in the substrate. The labelling substance may be a shading substance or a photocuring resin, and the energy is selected from the group consisting of visible rays, ultraviolet rays, infrared rays, X-rays, and electron beams.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

Best Available Copy

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-21636

(P2003-21636A)

(43) 公開日 平成15年1月24日 (2003.1.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト [*] (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 F 0 6 9
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
G 0 1 N 13/10		G 0 1 N 13/10	A 4 B 0 2 9
13/16		13/16	A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数25 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-207128 (P2001-207128)

(22) 出願日 平成13年7月6日 (2001.7.6)

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 尾崎 亘彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72) 発明者 岡 弘章

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

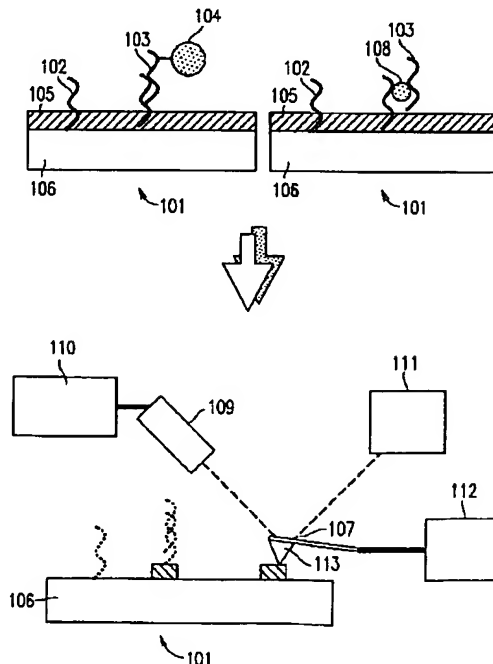
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面形状が変化するセンサ

(57) 【要約】

【課題】 溶液中の分析物を高密度に集積し、簡便かつ高感度で検出し得る方法、それに用いるデバイス、およびそれを備えた装置を提供する。

【解決手段】 目的の分析物を基板上的の少なくとも1つの領域に捕獲する工程、該分析物が捕獲された領域の幾何学的形状を改変する工程、および改変された幾何学的形状を検出し、それによって該分析物の存在を検出する工程を包含する分析物測定方法。上記幾何学的形状を改変する工程は、上記領域にエネルギーを与えることによって行われ、上記幾何学的形状を改変する工程は、基板に捕獲された分析物に特異的に結合する標識物質の存在下で行われ得る。この標識物質は、遮光物質、または光硬化性樹脂であり得、上記エネルギーは、可視光、紫外線光、赤外光、X線、および電子線からなる群から選択される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 目的的分析物を基板上の少なくとも1つの領域に捕獲する工程、該分析物が捕獲された領域の幾何学的形状を改変する工程、および改変された幾何学的形状を検出し、それによって該分析物の存在を検出する工程、を包含する、分析物測定方法。

【請求項2】 前記幾何学的形状を改変する工程が、前記領域にエネルギーを与えることによって行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記幾何学的形状を改変する工程が、基板に捕獲された分析物に特異的に結合する標識物質の存在下で行われる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 前記分析物が標識物質を有する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】 前記標識物質が遮光物質である、請求項3または4に記載の方法。

【請求項6】 前記標識物質が光硬化性樹脂である、請求項3または4に記載の方法。

【請求項7】 前記分析物が核酸である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記エネルギーが、可視光、紫外線光、赤外光、X線、および電子線からなる群から選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項9】 前記改変された幾何学的形状を固定処理する工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 分析物が捕獲されることによって幾何学的に形状変化し得るセンサ基板であって、支持層、および該支持層の上に配置された形状変化する層を備えた、基板。

【請求項11】 前記形状変化する層が、フォトレジスト樹脂を含む、請求項10に記載の基板。

【請求項12】 前記形状変化する層が、塑性変形する材料または非弾性変化する材料を含む、請求項10に記載の基板。

【請求項13】 分析物が捕獲されることによって形状変化した基板であって、支持層、および該支持層の上に配置された形状変化した層を備えた基板。

【請求項14】 前記形状変化した層が、固定処理されている、請求項13に記載の基板。

【請求項15】 前記分析物が特定の塩基配列を有する遺伝子であり、前記支持層に該遺伝子の核酸プローブが固定化された、請求項10に記載の基板。

【請求項16】 遺伝子を検出するための自動遺伝子検出装置であって、

請求項15に記載の基板、該基板を移動する手段、分析物を含有するサンプル溶液および該基板を収容する反応槽、該基板を洗浄する手段、該基板上の領域にエネルギーを付与する手段、および該基板の幾何学的形状変化を検出する手段を備える、装置。

【請求項17】 前記基板に捕獲された分析物に特異的

に結合する標識物質を収容する貯留槽をさらに備える、請求項16に記載の装置。

【請求項18】 前記幾何学的形状変化を検出する手段が、触針式表面粗さ計である、請求項16に記載の装置。

【請求項19】 前記触針式表面粗さ計が、振動型触針式表面粗さ計である、請求項18に記載の装置。

【請求項20】 前記振動型触針式表面粗さ計が、音叉型水晶振動子、電子回路用マイクロフォーク、圧電材料、または圧電性を有するセラミックを備える、請求項20に記載の装置。

【請求項21】 前記幾何学的形状変化を検出する手段が、光学式表面形状測定器である、請求項16に記載の装置。

【請求項22】 前記幾何学的形状変化を検出する手段が、走査型プローブ顕微鏡である、請求項16に記載の装置。

【請求項23】 前記走査型プローブ顕微鏡が、走査型トンネル顕微鏡、原子間力顕微鏡、摩擦顕微鏡、マクスウェル応力顕微鏡、磁気力顕微鏡、フォトン走査型トンネル顕微鏡、走査型近接視野光学顕微鏡、または走査型近接場音響顕微鏡である、請求項22に記載の装置。

【請求項24】 前記走査型プローブ顕微鏡が、プローブまたは探針と該遺伝子センサ基板の間に電圧を印加する手段を有する請求項22に記載の装置。

【請求項25】 前記プローブまたは探針が振動する機構を有する、請求項24に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、溶液中の分析物を簡便かつ高感度で検出する方法、それに用いるデバイス、およびそれを備えた装置に関する。より詳細には、本発明は、溶液中に目的の核酸が存在するか否かを特異的に検出する方法、それに用いる基板（遺伝子センサ）、およびこの基板を備えた遺伝子検出装置に関する。本発明の方法およびデバイスは高密度の集積化が可能であって、治療などの薬剤のスクリーニング、遺伝子のフィンガープリンティング、ハイブリダイゼーションによる遺伝子の塩基配列の決定（SBH: Sequencing By Hybridization）に適用可能である。

【0002】

【従来の技術】生物中に存在する全遺伝子の数は、酵母で約6,000個、ヒトで約100,000個といわれている。ヒトの遺伝子の配列決定はほぼ終了しており、また、ヒト遺伝子の80%以上は、EST（Expressed Sequence Tag: cDNAの末端から200～300塩基の配列を読んだもの）として、それらの一部配列が既に公表されているといわれている。

【0003】一般に、細胞または組織ごとの遺伝型の解

析、遺伝子発現パターンの比較、遺伝子変異多型のマッピング(診断)、ゲノムに存在する機能的塩基配列の解析などの遺伝子検出法では、一本鎖に変性した遺伝子サンプルに特異的にハイブリダイズした核酸プローブを検出することによって目的遺伝子の存在が確認される。最近、このような遺伝子検出法では、DNAチップが採用されている。例えば、Hyseq社は、DNAチップを用いた塩基配列解析法を開示する(米国特許第5,525,464号を参照のこと)。

【0004】DNAチップは、生体に含まれる全遺伝子を、1~2日間程度で解析可能といわれており、簡便で迅速な塩基配列の解析が可能であることから、DNAチップの利用技術開発は急速に進んでいる。しかし、DNAチップを用いて、未知の配列の決定を行う場合の問題点として、DNAチップが、遺伝子と核酸プローブとの間のいくつかの末端ミスマッチに対して完全マッチと同等のシグナルを与えることが指摘されている。それ故、この末端ミスマッチと完全マッチとの識別を正確に行う方法について技術的な検討が必要である。

【0005】DNAチップを含む従来技術の代表的な遺伝子分析法について説明する。まず、生物試料から遺伝子を抽出し、必要であれば適切な制限酵素で切断した後、電気泳動およびサザンブロットを行なう。次に、目的とする遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する核酸プローブを放射性同位元素または蛍光色素などで標識し、ブロットされた遺伝子とハイブリダイスさせる。次いで、ハイブリダイズした核酸を、低温でX線フィルムに感光させた後RIスキャナーを用いるか、レーザを照射して発生する蛍光放射を蛍光スキャナーを用いるか、または高感度CCDカメラなどの光検出器や光電子倍增管を用いて蛍光標識した物質を検出することで、ハイブリダイズした核酸プローブを検出し、それによって目的とする遺伝子の存在を確認する。

【0006】しかし、上記放射性同位元素を用いた検出法は、放射性同位元素を使用するため診断場所が限定され、試薬の取扱いにも十分注意しなければならない。また、遺伝子検出までに長時間を要し、測定操作もかなり複雑かつ複雑であるという問題がある。その操作も資格を有するオペレータが行なわなければならない。これに加えて廃棄物の処理などにも注意を必要とする。

【0007】この点を改善するために、放射性同位元素に代わる安全なラベル剤の開発が進められており、例えば、アビジン-ビオチン結合を利用する方法、酵素や蛍光物質を使用する方法など、いくつかのプローブ検出方法が既に提案されている。このような検出方法で用いられるスキャナーは、数十ミクロン程度のサイズを検出し得る性能を有し、間隔が100ミクロン程度のスポットを定量的に識別することができる。しかし、2波長、多いもので5波長のレーザを用いる場合など、多数の標識には十分対応できず、そして広範囲を高速でスキャンで

きない。例えば、共焦点レーザを用いたスキャナーは、5~50μmの比較的低い解像度しか有さず、上記のようなプローブ検出方法の高密度集積化の障害となっている。また、本当にターゲットの配列と合致した結合により蛍光を発しているのか、またはミスマッチのまま結合が起こって生じる非特異的な擬陽性の信号であるのかを評価することができないという課題を有している。

【0008】その他の検出法として、MALDI-TOF(Matrix-assisted laser desorption Time of Flight)を用いた質量分析検出法がある(例えば、Sequenom社のDNA Mass Array)。このTOF質量分析器は、サンプルをイオン化し、磁場型または、4重極型の装置により質量/電化比に従ってサンプル分子を分離し、発生したイオンが検出器を1周するのに要する時間を測定する。TOF質量分析器を用いれば、例えば、DNAチップに結合した目的の遺伝子のフラグメントをプライマー伸張反応することによって、結合した相補的なDNA配列のラダーを生じさせ、1~2ダルトンの精度でその質量を検出できる。しかし、その原理上、実際の分析時間は非常に短いにもかかわらず、一方で、生物学的サンプルを質量分析するまでには複雑なサンプル準備作業を行う必要があり、結果として測定に非常に時間がかかる。また、現在投入されているシステムが大掛かりであり、装置の準備等にも時間がかかる。

【0009】また、特開平10-23900号は、DNAハイブリダイゼーション反応を無標識で検出する方法および装置を開示している。この装置は、DNA分離抽出モジュール、増幅モジュール、および検出モジュールを備え、チップ上のプローブと、検体中の変性一本鎖DNAとのハイブリダイゼーションによって生じる2本鎖形成にともなう位相差の変化を検出する。

【0010】近年、極微細探針を用いた走査トンネル顕微鏡(Scanning Tunneling Microscopy:STM)に代表される走査型プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscopy:SPM)が開発され、これを用い、原子オーダーあるいは、ナノメートルオーダーの表面観察、原子操作や表面改質が盛んに行われるようになった。特にデータストレージ応用の観点から、記憶媒体の表面修飾や表面改質が行われ、ナノメートルサイズの凹凸構造が作製されている。走査型プローブ顕微鏡を用いれば、サンプル表面の幾何学的形状だけでなく、サンプルの磁気力分布、表面電位、光学情報などの物理特性をナノメートルオーダーの分解能で制御することが可能である。これは、探針とサンプル間に印加する電圧、これに伴う電子注入、熱、微小力などの作用をナノメートル領域で制御することで達成される。

【0011】中でも、1989年スタンフォード大のC. F. Ouate教授らのグループはSTMによる電

10

20

30

40

50

流加熱によりグラファイト表面にナノメートルオーダーのピット構造を形成し、超高密度記録の可能性を示した。これを契機に、現在、世界的にこのような微細加工技術を将来のストレージ技術に応用しようとする研究が盛んに行われている。例えば、1990年MaminらはSTMを用い、金の電界蒸発によるドット記録技術を示し、また、Betzigらも1992年近接場光顕微鏡SNOMによる光磁気記録を示し、日本国内でもSatohらがSTMによる相変化記録を示し、Hosokuraらが原子操作によるアトミックストレージの可能性の検証を行った。

【0012】また、M. Despondらは、M. Despondら、「VLSI-NEMS Chip for AFM Data Storage」、IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest 1999、pp564-569において、SPMプローブ（探針）先端の耐摩耗性の向上、探針の加熱機構の搭載などによって、たわみ検出センサを搭載したAFM探針を、同一平面で32×32のマトリクス状に配列し、加熱した探針をPMMA樹脂製の記録媒体に押し付けることで窪みを形成し、凹凸を検出することでデータを記録および再生するデータストレージ装置のプロトタイプを示した。この方式によって記録されたデータマークサイズは約40nmであり、400GB/inch²の記録密度に相当する。

【0013】その他には、Vettiger, P.; Despont, M.; Drechsler, U.; Durig, U.; Haberle, W.; Lutwyche, M. I.; Rothuizen, H. E.; Stutz, R.; Widmer, R.; Binnig, G. K. 「Millipede」 more than one thousand tips for future AFM data storage, IBM Journal of Research and Development, Vol. 44, Issue 3 323-340, 2000などがある。しかし、本発明者らの知る限り、走査型プローブ顕微鏡をDNAチップと組み合わせ、遺伝子分析法に適用した先行技術は存在していない。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記従来技術の課題を解決し、溶液中の分析物を高密度に集積し、簡便かつ高感度で検出し得る方法、それに用いるデバイス、およびそれを備えた装置を提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は分析物測定方法に関し、この方法は、目的の分析物を基板上の少なくとも1つの領域に捕獲する工程、上記分析物が捕獲された

領域の幾何学的形状を改変する工程、および改変された幾何学的形状を検出し、それによって上記分析物の存在を検出する工程を包含する。

【0016】好ましくは、上記幾何学的形状を改変する工程は、上記領域にエネルギーを与えることによって行われる。

【0017】好ましくは、上記幾何学的形状を改変する工程は、基板に捕獲された分析物に特異的に結合する標識物質の存在下で行われる。

【0018】好ましくは、上記分析物は標識物質を有する。

【0019】好ましくは、上記標識物質は遮光物質である。

【0020】好ましくは、上記標識物質は光硬化性樹脂である。

【0021】好ましくは、上記分析物は核酸であり得る。

【0022】好ましくは、上記エネルギーは、可視光、紫外線光、赤外光、X線、および電子線からなる群から選択される。

【0023】好ましくは、上記方法は、上記改変された幾何学的形状を固定処理する工程をさらに包含する。

【0024】本発明は、1つの局面で、分析物が捕獲されることによって幾何学的に形状変化し得るセンサ基板に関し、この基板は、支持層、およびこの支持層の上に配置された形状変化する層を備える。

【0025】好ましくは、上記形状変化する層は、フォトリソ樹脂を含む。

【0026】好ましくは、上記形状変化する層は、塑性変形する材料または非弾性変化する材料を含む。

【0027】本発明はまた、1つの局面で、分析物が捕獲されることによって形状変化した基板に関し、この基板は、支持層、およびこの支持層の上に配置された形状変化した層を備える。

【0028】好ましくは、上記形状変化した層は、固定処理されている。

【0029】好ましくは、上記分析物は特定の塩基配列を有する遺伝子であり、上記支持層にこの遺伝子の核酸プローブが固定化されている。

【0030】本発明はまた、1つの局面で、遺伝子を検出するための自動遺伝子検出装置に関し、この装置は、上記基板、この基板を移動する手段、分析物を含有するサンプル溶液および該基板を収容する反応槽、上記基板を洗浄する手段、この基板上の領域にエネルギーを付与する手段、およびこの基板の幾何学的形状変化を検出する手段を備える。

【0031】好ましくは、この装置は、上記基板に捕獲された分析物に特異的に結合する標識物質を収容する貯留槽をさらに備える。

【0032】好ましくは、上記幾何学的形状変化を検出

する手段は、触針式表面粗さ計である。

【0033】好ましくは、上記触針式表面粗さ計は、振動型触針式表面粗さ計である。

【0034】好ましくは、上記振動型触針式表面粗さ計は、音叉型水晶振動子、電子回路用マイクロフォーク、圧電材料、または圧電性を有するセラミックを備える。

【0035】好ましくは、上記幾何学的形状変化を検出する手段は、光学式表面形状測定器である。

【0036】好ましくは、上記幾何学的形状変化を検出する手段は、走査型プローブ顕微鏡である。

【0037】好ましくは、上記走査型プローブ顕微鏡は、走査型トンネル顕微鏡、原子間力顕微鏡、摩擦力顕微鏡、マクスウェル応力顕微鏡、磁気力顕微鏡、フォトン走査型トンネル顕微鏡、走査型近接視野光学顕微鏡、または走査型近接場音響顕微鏡である。

【0038】好ましくは、上記走査型プローブ顕微鏡は、プローブまたは探針と該遺伝子センサ基板の間に電圧を印加する手段を有する。

【0039】好ましくは、上記プローブまたは探針は、振動する機構を有する。

【0040】

【発明の実施の形態】以下では、目的の分析物が核酸、特にDNAである場合の本発明の実施の形態について説明するが、これらは本発明の例示であって、限定するものではない。

【0041】（実施の形態1）本実施の形態では、表面にフォトレジストを塗布した基板を遺伝子センサとして用いる。フォトレジストとしては、光曝露で溶けるポジ型フォトレジストまたは光曝露で重合するネガ型フォトレジストを用い得る。

【0042】図1に、ポジ型フォトレジストを用いる本実施の形態の概略、およびこれに用いる遺伝子センサの概略を示す。図示されるように、基板101は、支持層106およびポジ型フォトレジスト層105を備える。支持層106として、単結晶シリコン、アモルファスシリコン、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表される半導体材料；ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスファイト、セラミクスなどの無機材料；およびポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、シリコーン樹脂、ポリフェニレンオキサイドおよびポリスルホンなどの有機材料を用い得る。好ましくは、アモルファスシリコン、またはガラスが支持

層106として用いられる。

【0043】ポジ型フォトレジスト層105として、ノボラック樹脂をベース樹脂とするノボラック樹脂-ジアゾナフトキノン（DNQ）系レジスト、ポリメチルメタクリレート（PMMA）およびPMMAとの共重合体、ポリメチレンスルホン、ポリヘキサフルオロブチルメタクリレート、ポリメチルイソプロピルケトン（PMIPK）、放射線分解型ポリマーレジスト=臭化ポリトリメチルシリルプロピンなど、溶解抑制剤系レジスト=コール酸-0-ニトロベンジルエステルなどの材料が用いられ得る。好ましくは、ノボラック樹脂-ジアゾナフトキノン（DNQ）系レジストが用いられる。

【0044】測定に際しては、基板101の支持層106上に、一本鎖に変性された核酸プローブ102が所定の間隔でシランカップリングなどの方法により固定化される。核酸プローブの固定化は当業者に公知の任意の方法を用いて行われ得る。なお、本明細書で用いる用語「遺伝子センサ」は、核酸プローブが固定化された基板をいうために用いる。図1の左上では、分析物核酸103に、標識物質として、遮光物質104が結合されて示される。遮光物質104として、チタン白、カーボン黒、亜鉛華、湯煙、黄鉛、トルイジンブルーなどの有色顔料などの無機材料、または、鉄、コバルト、亜鉛、チタン、錫、アルミ、ニッケル、およびマンガンから選ばれる金属の混合物、およびこれら金属の錯体などを用い得る。遮光物質104は、当業者に公知の任意の方法を用いて分析物核酸103に結合し得る。あるいは、図1の右上に示すように、分析物核酸103と一本鎖核酸プローブ102とのハイブリダイゼーションの際に、光を遮蔽する遮光基をもった二本鎖だけに特異的に挿入される挿入剤108を存在させ、形成される二本鎖に導入してもよい。このような挿入剤として、例えば、フェニル基などの平板状挿入基を有する二本鎖挿入剤がある。例として、ビビリジンプラチナ錯体、タービリジンプラチナ錯体などのプラチナ錯体、クロム錯体、亜鉛錯体、コバルト錯体などがあげられる。核酸プローブと分析物核酸とのハイブリダイゼーションの条件は、当業者に公知であり、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1982)などの成書に記載されている。

【0045】ハイブリダイゼーションの後、光源109により基板の表面領域に紫外線光を照射する。紫外線光への曝露によりポジ型フォトレジスト層105は溶解する。その一方、遮光修飾物質104もしくは遮光挿入剤108が存在する領域、つまり形成された二本鎖が捕捉された基板の領域（以下二本鎖形成領域）は遮光されるため、ポジ型フォトレジスト層105は、図1の下に示されるように溶解せずに残る。

【0046】ここで、AFM探針113などにより、支持層106の表面上に残ったポジ型フォトレジスト層により形成される凹凸形状を、AFM駆動装置112により走査する。AFM (Atomic Force Microscopy: 原子間力顕微鏡) は、STMで絶縁体の表面形状を測定するために、STMを発明したビニツヒ博士が、米国スタンフォード大学のクウェート教授と共同で考案した装置である。AFMでは、STM探針と絶縁体試料表面の間に小さな柔らかいテコが挿入されている。ここで、レーザ光源109からレーザをAFM探針107背面に斜めから入射し、探針の変位によるレーザ光の反射角度の変化を位置解析装置111を用いて読み取り、支持層106の表面凹凸形状を知ることにより、核酸プローブと分析物核酸とのハイブリダイゼーションを検出し得る。

【0047】なお、このような、凹凸形状が刻印された基板101は、例えば、120℃で10分間ベイクすることにより、その形状を半永久的に保存し得、必要に応じて、随時、被験試料のデータベースとして用い得る。

【0048】図2に、ポジ型レジストをマスクとして用い、図1に示す実施の形態に加え、さらに支持層をエッチングする本発明の改変例の概略を示す。

【0049】基板の構成は図1に示す例と同じである。ハイブリダイゼーションの後、光源109から基板101表面に紫外線を照射することによって形成された、二本鎖形成領域213のみを、ポジ型フォトレジスト105を用いてマスクをバターンニングする。その後、支持層106をエッチングなどによりさらに加工することで、図2の下に示される支持層形状114に見られるように、支持層106において、二本鎖形成領域の凹凸形状が拡大される。

【0050】このようなエッチングする工程をさらに行うことで、i) 二本鎖形成領域の凹凸形状が拡大されて、形状測定の感度が増大する、そしてii) 支持層を加工することにより、被験試料のデータベースとして基板の保存性が高められる、という効果が得られる。

【0051】エッチングは、当業者に公知の任意の方法によって行われ、これには、ドライエッチング、またはウェットエッチングのいずれをも適用され得る。支持層を腐食させるエッチャントは、必要に応じて、等方性のエッチャント、または異方性のエッチャントが選択され得る。等方性のウェットエッチャントとして、例えば、単結晶シリコン (Si) を熱酸化することにより得られたシリコン酸化膜 (SiO₂) を支持層106として用いる場合、フッ酸 (HF) とフッ化アンモニウム (NH₄F) が知られる。等方性のドライエッチャントとして、例えば、ポリシリコン (p-Si) を支持層106として用いる場合、CF₄ガスが知られる。異方性のウェットエッチャントとして、単結晶シリコンを支持層106として用いる場合、水酸化カリウム、ヒドラジン、

EPW (エレチンジアミン-ピロカテコール水)、TMAH (水酸化テトラメチルアンモニウム) など知られる。いずれも結晶面に対するエッチング速度の違いを利用して異方性を実現するが、TMAHが好適に用いられる。異方性のドライエッチャントとして、CF₄ガスを主成分とするその他の成分との混合ガスで異方性エッチングを実現することが知られている。

【0052】図3に、等方性エッチングを施したときに得られる基板支持層の形状115、および異方性エッチングを施したときに得られる基板支持層の形状116を示す。図3に示されるように、異方性エッチングでは、支持層は、その結晶面に沿って加工されるため、二本鎖形成領域は、拡大された凸形状 (底面積が大きい台地形状) として拡大される。

【0053】次に、ネガ型フォトレジストを用いる例について説明する。

【0054】図4は、ネガ型フォトレジストを用いる本発明の方法の概略、およびこれに用いる遺伝子センサの概略である。上記のポジ型フォトレジストを用いる場合と比べ、フォトレジスト層がネガ型フォトレジスト層417であることを除いて基板の構成は同じである。ネガ型フォトレジスト層417の材料として、UVレジストである環化ポリイソブレン-芳香族ビスアジド系レジスト、フェノール樹脂-芳香族アジド化合物系レジスト、ポリビニルフェノール-3, 3'-ジアジドジフェニルスルホン、ポリメタクリ酸グリシジルなどを用い得る。環化ポリイソブレンをベースポリマーとするアジド化合物、例えば、2-6-ジ (4-ジドベザール) -4-メチルシクロヘキサノンなどが好適に用いられる。

【0055】この例では、ハイブリダイゼーションの後、光源109 (図示せず) からの紫外線の照射によってネガ型フォトレジスト層417は光重合する。その一方、遮光修飾物質104または遮光挿入剤108が存在する領域は遮光されるため、ネガ型フォトレジスト層417は光重合せずに溶解する。

【0056】ネガ型フォトレジスト層を用いる場合においても、支持層をさらにエッチングすることにより二本鎖形成領域の形状を拡大し得る。これは、ネガ型レジストをマスクとして支持層をエッチングすることにより達成される。二本鎖形成領域のみを選択的に、ネガ型フォトレジスト417を用いてマスクをバターンニングする。その後、支持層106をエッチングにより加工することで、図4の下に示す支持層形状418に見られるように、支持層106には、二本鎖形成領域に形成された凹部の深さが拡大される。

【0057】このようなエッチングする工程をさらに行うことで、ネガ型フォトレジストを用いた場合にも、i) 二本鎖形成領域の凹凸形状が拡大されて、形状測定の感度が増大する、そしてii) 支持層を加工することにより、被験試料のデータベースとして基板の保存性が

高められる、という効果が得られる。

【0058】図5に、等方性エッチングを施したときの基板支持層の形状519、および異方性エッチングを施したときの基板支持層の形状520を示す。図5に示されるように、等方性エッチングでは、支持層は、その結晶面に沿って加工され、二本鎖形成領域は凹形状として拡大される。

【0059】（遺伝子センサの製造例と使用）基板101の支持層106として単結晶シリコンを用いた。最初に、単結晶シリコンを含む支持層106をクリーンオーブン内で20分間ベイクした。支持層106の表面を脱水した後、スピナーを用いて、フォトレジストを3500rpmで30秒間スピコートして成膜し、90℃で10分間ベイクした。

【0060】得られた基板101を、NaOH+95%エタノールに室温で2時間ゆっくりと振盪しながら浸漬した。次いで、蒸留水で3回リンスした後、基板101を、ポリLリシン（P8920、シグマ社製）希釈液に1時間浸漬した。基板101をこの希釈液から取り出し、マイクロタイタープレート用遠心機を用いて500rpmで1分間遠心し、残存するポリLリシン希釈液を除いた後、吸引式恒温機に入れ、40℃で5分間乾燥させた。

【0061】得られた基板101の表面に、核酸プローブとして、10μMのK-ras DNA ligand (5'-CCA-CCA-GCT-CCG-5') / TEバッファー溶液（10mM Tris, 1mM EDTA（エチレンジアミン四酢酸））を10μlスポットし、風乾することによりこの一本鎖DNAを基板表面に固定した。なお、A、T、G、Cは、それぞれDNA核酸の塩基配列を示す。

【0062】次いで、基板を純水で洗浄した後、分析物核酸として10μM K-ras DNA ligand (5'-CCA-CCA-GCT-CCG-5') / TEバッファー溶液を50μl加えて、65℃恒温槽中で10時間ハイブリダイゼーション反応をおこなった。そのまま基板を0.03% SDS、SSC（塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム）中に静かに入れ、軽く洗浄後、取り出し、マイクロタイタープレート用遠心機を用いて500rpm、1分間遠心分離し、水分を飛ばした。次いで、4秒間露光し、そして70秒間現像した。得られた基板を純水で30秒リンスした後、120℃で10分間ベイクした。AFM探針707を用い、得られた基板上の2μm×2μmの領域を走査し、表面形状を測定した。

【0063】（実施の形態2）本実施の形態では、光硬化性樹脂を用い、遺伝子センサの二本鎖形成領域に光硬化性樹脂を凝集させて基板上に凸部を形成する。

【0064】図6に、本実施の形態、およびこれに用いる基板の概略を示す。基板601は支持層606からな

る。支持層606として用いられる材料として、単結晶シリコン、アモルファスシリコン、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表される半導体材料；ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスフェイト、セラミクスなどの無機材料；およびポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニレンオキサイドおよびポリスルホンなどの有機材料が用いられ得る。好ましくは、基板材料として石英ガラスが用いられる。

【0065】測定に際しては、上記実施の形態1と同様に、支持層606上に一本鎖に変性された核酸プローブ102を所定の間隔でシランカップリングなどにより固定化する。ここで、分析物核酸103には、あらかじめ光硬化性樹脂604が結合されている（図6の上の左に示される）。あるいは、分析物核酸103と、一本鎖核酸プローブ102とがハイブリダイズするときに、光硬化を起こす官能基をもつ、二本鎖だけに特異的に挿入される挿入剤605を存在させ形成される二本鎖に挿入してもよい（図6の上の右に示される）。いずれの場合も、光に暴露されると硬化する光硬化性の性質を持つ材料が、二本鎖形成位置にだけ特異的に存在することになる。光硬化性樹脂604として、ベンゾフェノンまたはその置換誘導体、ベンゾインまたはその置換誘導体、アセトフェノンまたはその置換誘導体、ベンジルオキシムなどのオキシム系化合物などから選択される1つ以上の光重合開始剤を約2～10重量%含有する、ポリエステルアクリレート、エポキシアクリレート、ウレタンアクリレートなどが好適に用いられ得る。その他、必要に応じ、光硬化性樹脂604は、増感剤、充填剤、不活性有機ポリマー、レベリング剤、チキソトロップ性付与剤、熱重合禁止剤などの助触媒的な役割を持つ化学物質を適宜含み得る。

【0066】ハイブリダイゼーション反応の後、光源609によって基板に光を照射する。用いられる光硬化性樹脂に依存して、200nm～800nmの波長を有する光を基板に照射する。紫外線光が好適に用いられる。光の照射によって硬化した樹脂は、基板601上の二本鎖形成領域で凝集し、凸形状の凝集体613を形成する。

【0067】ここで、AFM探針113などにより、支持層601の表面上に形成された凝集体の形状を、AFM駆動装置112により走査する。ここで、AFM探針

10

20

30

40

50

の背面107にレーザ光源109からレーザを照射し、AFM探針113を追従するレーザ光源109の位置を解析装置111を用いて読み取ることにより、プローブと分析物核酸とのハイブリダイゼーションを検出し得る。

【0068】このような、凝集体613を有する基板もまた、例えば、120℃で10分間ベイクすることにより、半永久的に保存し得、必要に応じて、随時、被験試料のデータベースとして用い得る。

【0069】(遺伝子センサの製造例および使用) 支持層606として、スライドガラス(Gold Seal Brand社製3010スライドガラス)を用いた。スライドガラスをNaOH+95%エタノール溶液に室温で2時間浸漬した後、蒸留水で3回リンスした。次いでスライドガラスをポリリシン(P8920シグマ社製)希釈液に1時間浸漬した。ポリリシン希釈液からスライドガラスを取り出し、マイクロタイタープレート用遠心機にて500rpmで1分間遠心分離して過剰のポリリシン希釈液を取り除いた後、吸引式恒温機に入れ、40℃で5分間乾燥させた。

【0070】紫外線硬化樹脂EHA(2-エチルヘキシルアクリレート、 $\text{CH}_2=\text{CHCOOCH}_2\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$)の末端にアクリロイル基($\text{CH}_2=\text{CHCO}-$)を導入し、10μM 5'アミノ化K-ras DNA(5'-H₂N-C₆H₄-CGG-AGC-TGG-TGG-3')(A、T、G、CはDNAの塩基配列を示す)を標識するために用いた。光重合モノマー(EHA)標識K-ras DNA/TEバッファー溶液(10mM Tris、1mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸))を、乾燥したスライドガラスの基板上に10μlスポットし、一本鎖DNAを基板表面に固定化した(遺伝子センサ)。さらにこの遺伝子センサを純水で洗浄した後、10μM K-ras DNA ligand(5'-CCA-CCA-GCT-CCG-3')/TEバッファー溶液を50μl加え10時間浸漬してハイブリダイゼーションを行い、遺伝子センサ表面に、二本鎖DNAを形成させた。

【0071】次いで、遺伝子センサを紫外線に曝した(露光時間:4秒×2回)。そして70秒間現像を行った後、純水で30秒間リンスした。洗浄した遺伝子センサを120℃で10分間ベイクした後、AFM探針およびAFM駆動装置を用い、支持層の表面上に形成された凝集体の形状を走査した。

【0072】なお、上記実施の形態1および2においては、フォトレジストとして、光露光用フォトレジストである環化ゴム、ポリけい皮酸およびノボラック樹脂などを主原料とするもの、遠紫外用フォトレジストである環化ゴム、フェノール樹脂、ポリメチルイソプロピルケトン(PMIPK)およびポリメチルメタクリレート(PMMA)などを主原料とするもの、X線用フォトレ

ジストであるCOPおよびメタルアクリレートを主原料とするもの、または、薄膜ハンドブック(日本学術振興会薄膜第131委員会編、第1版、昭和58年12月10日、オーム社)に記載されたもの電子線用レジストであるPMMAをはじめとする、上記ハンドブックに記載された任意のフォトレジストを目的に応じて選択し用いることができる。

【0073】(実施の形態3) 本実施の形態では、AFM探針(AMFカンチレバー)を用い、これに電荷を印加してタッピングすることによって基板上に配置した塑性変形層の二本鎖形成領域をへこませて窪みを形成し、その形状変化を測定する。

【0074】図7に、本実施の形態に用いるデバイスの概略を示す。図7に示されるように、AFM探針706の基部は、圧電素子707に接合されており、圧電素子707に電源708から電圧を印加することにより、AFM探針706を振動させることができる。印加する電圧は、通常、0.1mV~100Vの範囲の電圧である。また、AFM探針706が振動する振幅は、通常、10nm~100μmの範囲である。圧電素子707は、当業者に公知の、単層型、バイモルフ型、積層型のいずれの圧電素子も用いることができ、特にバイモルフ型の圧電素子が好適に用いられる。基板701は、支持層704および塑性変形層705を備える。

【0075】支持層704として、単結晶シリコン、アモルファスシリコン、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表される半導体材料;およびガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスフェイト、セラミクスなどの無機材料が用いられ得る。

【0076】塑性変形層705として、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、シリコーン樹脂、ポリフェニレンオキサイドおよびポリスルホンなどの有機材料が好適に用いられる。より好ましくは、ポリカーボネイト、またはPMMA樹脂を塗布したポリカーボネイトが塑性変形層705として用いられる。

【0077】この塑性変形層705に、核酸プローブを固定化する。ハイブリダイゼーションの後、基板を乾燥し、AFM探針706をサンプル表面にソフトコンタクトさせる。コンタクト圧力は、0.1nNから1mNの範囲で調整するが、約100nNのコンタクト圧力が好適に用いられる。必要に応じて、二本鎖形成位置でAFM探針の裏面にレーザ光を照射し、探針を加熱する。あ

るいは、レーザ光源709により印加されるレーザ光は、AFM探針706の先端面に直接照射し得る。レーザとして、固体半導体レーザ、CO₂レーザ、YAGレーザ、エキシマレーザなどを用い得る。波長200nm付近のエキシマレーザが好適に用いられ得る。

【0078】加熱された探針の熱は、遺伝子センサ表面に伝達され、二本鎖形成領域では、二本鎖を解離するためのエネルギーとして用いられるため、二本鎖形成領域以外の領域に比べ、サンプルの塑性変形降伏点が大きくなることに起因して、二本鎖形成領域に加熱により形成される凹構造（ナノメートルサイズ）は、一本鎖のプローブ核酸が固定化された領域で加熱により形成される基板表面の凹構造より小さくなる。図8にその概略を示す。このようにして形成された基板表面上の凹凸構造を読み取ることで、二本鎖形成反応を検出することができる。このような基板表面上の凹凸構造を読み取るとき、AFM探針706の裏面に、出力の弱いレーザ光をレーザ光源709から照射し、反射したレーザ光をフォトマル711で信号を増幅して位置検出器712に伝えて検出する（光で検出法）。なお、常温時の塑性変形材料の塑性変形降伏点は大きいので、基板表面は塑性変形を起こさない。

【0079】（遺伝子センサの製造例および使用例）支持層704として、30mm角、厚さ525μmの単結晶シリコン小片を用いた。この単結晶シリコン小片を600℃で熱酸化し、最表面にSiO₂層を形成してセンサ基板を得た。その後、PMMA（メチルメタクリレート）樹脂を厚さ2μm堆積させた。TEバッファ溶液（10mM Tris、1mM EDTA（エチレンジアミン四酢酸））100μl中に、K-ras DNA ligand（5'-CCA-CCA-GCT-CCG-5'）を溶かして終濃度10μMとした。次いで、アミノプロピルトリエトキシシランを用いて基板のPMMA樹脂の側鎖を活性化し、K-ras DNA ligandを2箇所（30）に架橋した。なお、A、T、G、CはDNAの塩基配列を示す。

【0080】このDNA ligandを架橋した基板を純水で洗浄した後、上記2箇所の内の1箇所に10μM K-ras DNA ligand（5'-CCA-CCA-GCT-CCG-5'）/TEバッファ溶液を50μl加え、10時間浸漬し、ハイブリダイゼーションを行って、基板表面に二本鎖DNAを形成させた。

【0081】この基板に、AFM探針を圧力100nNで接触させ、AFM探針の背面にスポット径1μm半導体レーザ光を照射し、そして圧電素子に50V印加してAFM探針を振動させながら、基板の二本鎖形成領域、一本鎖K-ras DNA ligand固定化領域、およびPMMA樹脂表面の合計3箇所、それぞれについて2μm×2μmの領域を走査した。その後、レーザ照射をやめ、接触圧力10nNで走査し、基板の同じ3

箇所の2μm×2μmの範囲の表面凹凸形状を測定した。

【0082】測定の結果、二本鎖形成領域に形成された凹部の開口部の直径は100nmであった。その一方、一本鎖K-ras DNA ligand固定化領域の凹部の開口部の直径はやや小さかった。AFM探針の接触圧力が一定なため、凹部深さは、凹部の開口部の直径に比例する。凹部の開口部の直径が100nmであったので、基板上に、固定ピッチ200nmで遺伝子を固定化すれば、1.5×10⁸サンプル/cm²の高密度で遺伝子検出が可能である。

【0083】（実施の形態4）本実施の形態では、導電層をもつAFM探針（AFMカンチレバー）を用い、これに電荷を印加して遺伝子センサの二本鎖形成領域を引っ掻いて熱膨張させて凸構造を形成する。

【0084】図9に本実施の形態、および遺伝子センサの概略を示す。図9に示すように、AFMカンチレバー907は導電層908を備え、従って、探針は導電特性をもつ。導電層908の製作方法としては、例えば、AFMカンチレバー907の基部に金属を成膜して形成され得る。成膜方法としては、蒸着、スパッタ、CVDなどを用い得、好ましくは真空蒸着法が用いられる。あるいは、半導体探針にボロンなどをドーピングして導電性を持たせてもよい。

【0085】基板901は支持層904と導電層905と塑性変形層906を備える。支持層904は、上記と同様に、単結晶シリコン、アモルファスシリコン、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表される半導体材料；およびガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスフェイト、セラミクスなどの無機材料であり得る。

【0086】導電層905として、白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウム、銀、水銀、タングステンなどの貴金属を含む電極が好適に用いられ、グラファイト、グラシーカーボン、パイロリティックグラファイト、カーボンペースト、カーボンファイバーに代表される炭素電極、酸化チタン、酸化スズ、酸化マンガンなどの酸化物電極を用い得る。

【0087】塑性変形層906には、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニレンオキサイドおよびポリスルホンなどの有機材料が好適に用いられる。より好ましくは、塑性

変形層906としてポリスチレンが用いられる。

【0088】この塑性変形層906に核酸プローブ102を上記と同様に固定化する。ハイブリダイゼーションの後、AFM探針907をサンプル表面にソフトコンタクトさせながら走査する。コンタクト圧力は、0.1nNから1mNの範囲で調整するが、約60nNのコンタクト圧力が好適である。AFM探針を接触させ走査することで、塑性変形層はスクラッチ（削られる）される。その際に、基板901の導電層905と、AFM探針907の導電層908の間に、電圧印加装置913によって高周波電圧を印加することで探針付近の熱により、塑性変形層のポリマーが塑性変形を起こして隆起する。この電圧は、基板901の導電層905と、AFM探針907の導電層908との間に電圧印加装置913により印加される。通常、0.1mV～100Vの範囲の、1KHz～100MHzの電圧が印加される。好ましくは、50MHz付近の高周波電圧が印加される。

【0089】一般に、上記の隆起高さは、ポリマーの誘電体損失量に依存する。核酸自身は不導体であるため、一本鎖の核酸プローブ固定領域に比べ、二本鎖形成領域では、探針と基板との間の誘電率は高くなり、誘電体損失量は大きくなる。つまり、二本鎖形成領域に形成されるサンプル表面の凸構造（ナノメートルサイズ）は、一本鎖の核酸プローブ固定化領域に形成される凸構造より大きくかつ高くなる。

【0090】このように形成された、基板表面上の凹凸構造を読み取り、二本鎖形成反応を検出することができる。

【0091】なお、基板表面の凹凸構造を読み取る際には、図10に示すように、AFM探針907の裏面にはレーザ光源909から出力の弱いレーザ光909を照射し、フォトマル911で信号を増幅し位置検出器912に伝える。読み取りは上記のように、光で検出法によるのが望ましい。

【0092】（遺伝子センサの製造例および使用）基板901の支持層904として石英ガラスを用いた。支持層904上に、真空蒸着により銀を蒸着し導電層905として成膜した。次いで、その上にポリスチレンのベンゼン溶液をスピンコートし、95℃で20時間アニーリングし塑性変形層906を作製した。実施の形態1および2の（遺伝子センサの製造例および使用）と同様に、核酸プローブの固定およびハイブリダイゼーション反応を行った後、ボロンをドーパし導電性を持たせた銀を含む導電層をもつAFM探針を、60nNのコンタクト圧力で接触させ、2μm×2μmの領域を、50MHzで印加しながら走査した。印加電圧8Vのとき、約10μmの隆起が観察された。

【0093】（実施の形態5）図11は本発明の自動遺伝子検出装置の概略を示す図である。図11に示すように、本発明の遺伝子検出用測定装置は、核酸プローブが

固定化された遺伝子センサ33、この遺伝子センサを移動する手段43、一本鎖に変性した遺伝子核酸サンプルを含有するサンプル溶液を貯留するリザーバ31、遺伝子核酸サンプルと遺伝子センサ上の核酸プローブとのハイブリダイゼーションを行う反応槽32、サンプル溶液の温度を制御する温度制御装置34、ハイブリダイゼーション反応の後、遺伝子センサを洗浄して未反応のサンプル溶液を除去するための洗浄手段29、遺伝子センサ33上の領域にエネルギーを付与する手段38（露光装置、電圧印加装置など）、および遺伝子センサの幾何学的形状変化の測定する装置37を備える。エネルギー付与手段38は、例えば、計算機41で生成される信号に従って、制御装置39によって制御され得る。参照番号36は、必要に応じて配置される遺伝子センサ33を走査するためのカンチレバーである。

【0094】さらに、本発明の自動遺伝子検出装置は、標識物質を含有する溶液を貯留し、標識物質と、核酸プローブと遺伝子核酸サンプルとのハイブリダイゼーション反応の際、または遺伝子センサ表面上に形成された二本鎖核酸とを反応させることにより標識物質を二本鎖核酸に結合するように貯蔵する、標識物質リザーバ42を備え得る。上記標識物質リザーバ42は、図11に参照番号30で概略的に示す部材は、必要に応じて設置される核酸解離装置であって、遺伝子センサ上に形成された二本鎖を乖離するための部材であって、遺伝子センサの再利用を可能にするための部材である。また参照番号35は、遺伝子センサを移動するための移動ステージであって、遺伝子センサを、上記のそれぞれ、洗浄手段29、サンプル溶液リザーバ31、反応槽32、および核酸解離装置30に移動させる。

【0095】上記遺伝子センサの幾何学的形状変化を測定する装置37として、例えば、触針式表面粗さ計が採用され得る。この触針式表面粗さ計は、探針36が、音叉型水晶振動子、電子回路用マイクロフォーク、もしくはPZTに代表される圧電材料または圧電性を有するセラミックから構成される。あるいは振動する機構をもつタッピングスタイルス（振動型触針式表面粗さ計）であってもよい。

【0096】あるいは、上記遺伝子センサの幾何学的形状変化を測定する装置37として、光学式表面形状測定器、特に走査型プローブ顕微鏡（scanning probe microscopy；SPM）が好適に用いられる。

【0097】本明細書で用いる用語「走査型プローブ顕微鏡」は、原子レベルでの観察が可能な走査型顕微鏡の総称である。より詳細には、走査型トンネル顕微鏡（scanning tunneling microscopy；STM）、原子間力顕微鏡（atomic force microscopy；AFM）、摩擦力顕微鏡、マクスウェル応力顕微鏡、磁気力顕微鏡、フォト

ン走査型トンネル顕微鏡、走査型近接視野光学顕微鏡 (near-field optical microscope; SNOM)、走査型近接場音響顕微鏡などが挙げられる。AFMは斥力型、引力型およびタッピング型(「タッピング型」は、アメリカ合衆国カリフォルニア州サンタバーバラに所在するデジタルインスツルメント社の登録商標)などに大別され、この分野における研究の進展は著しく、摩擦力顕微鏡、マクスウェル応力顕微鏡、磁気力顕微鏡、フォトン走査型トンネル顕微鏡、フォトン走査型トンネル顕微鏡、走査型近接視野光学顕微鏡 (near-field optical microscope; SNOM) などの新しい顕微鏡が開発されている。本発明の自動遺伝子検出装置には、いずれの走査型プローブ顕微鏡も適用可能である。

【0098】STMに関する技術は、例えば文献(G. Binnigら、IBM J. RES. DEVELOP.、30(4):355-369、1986; Conrad Schneikerら、J. of Microscopy、152(2):585-596、1988; H. Kaisuka、Rev. Sci. Instrum.、60(10):3119-3122、1989)を参考にすることができる。

【0099】また、AFMに関する技術は、文献(G. Binnigら、Physical Review Letters、56(9):930-933、1986; T. R. Albrechtら、J. Appl. Phys.、62(7):2599-2602、1987; A. L. Weisenhornら、Appl. Phys. Lett.、54(26):2651-2653、1989; T. R. Albrechtら、J. Vac. Sci. Technol.、A8(4):3386-3396、1990; R. C. Barrettら、Rev. Sci. Instrum.、62(6)、1991)を参考にすることができる。

【0100】SNOMに関する技術は、例えば文献(Pohlら、J. of Microscopy、152(3):853-861、1988; Constant A. J. Putmanら、Appl. Phys. Lett.、64(18):2454-2456、1994; N. F. van Hulst、Appl. Phys. Lett.、62(5):461-463、1993)を参考にすることができる。

【0101】また、これらSPMの技術により、生物学的材料を測定し画像化する参考技術は、文献(Zasdzinski et al.、Science、239:1013-1015、1988; Emchら、J. of Microscopy、152(1):85-92、1988; Martiら、J. of Microscopy、152(3):803-809、1988; Drakeら、Science、243:1586

-1589、1989; Gouldら、J. Vac. Sci. Technol.、8(1):369-373、1990; Jerichoら、J. Vac. Sci. Technol.、8(1):661-666、1990; Coragterら、Micron、25(4):371-385、1994; Youら、Micron、26(4):311-315、1995)に記載されている。

【0102】さらに、核酸分子をSPMの技術により測定するための参考技術は、文献(Fengら、J. of Microscopy、152(3):811-816、1988; Driscollら、Nature、346:294-296、1990; FirtelおよびBeveridge、Micron、26(4):347-362、1995; YangおよびShao、Micron、26(1):35-49、1995; Rivettiら、J. Mol. Biol.、264:919-932、1996)に記載されている。

【0103】本発明の方法に適用されるSPMの詳細な操作技術は、以上の文献から適宜参照できる。本発明の自動遺伝子検出装置に用いる走査型プローブ顕微鏡において、プローブまたは探針と、遺伝子センサ基板との間に電圧を印加する手段、またはPZTに代表される圧電材料もしくは圧電性を有するセラミックから構成される、探針を振動させる機構を有してもよい。あるいは、探針の先端近傍に遺伝子センサの表面または裏面のいずれか一方にレーザ光を照射する手段を備えていてもよい。

【0104】代表的には、本発明の自動遺伝子検出装置においては、遺伝子センサ移動手段43を用いてカンチレバー36を走査し、遺伝子センサ33の任意の領域の幾何学形状を測定し得る。これは、遺伝子センサ移動装置43を制御する移動制御装置40および計算機41によって駆動され得る。計算機41には、カンチレバー36の走査を制御するプログラム、エネルギー付与手段38の光量や電圧値を任意に制御するプログラム、表面画像を取得、合成、および処理するプログラム、二本鎖核酸ハイブリダイゼーション量または解離量を数値化、可視化、計算、および統計処理を行うプログラム、これらの測定を自動化するプログラムを備え得る。

【0105】なお、本発明の自動遺伝子検出装置の上記各構成部材の詳細およびその連結は、特に詳細に説明しないが、当該分野の公知技術を採用し、当業者の知識に従って構成され得る。

【0106】本発明に係る銅張積層体の実施の一形態について説明したが、本発明は、これによって何ら限定されるものではなく、その趣旨を逸脱しない範囲で以て当業者の知識に基づき、種々なる改良、変更、修正を加えた状態で実施し得るものである。DNAを代表例として本発明を説明したが、本発明は、RNA、タンパク

質、多糖類、脂質および他の高分子の加工および分析にも応用可能である。本明細書引用された文献は、各文献に掲載されている核酸配列およびアミノ酸配列を含めて、それらの全体が参照として本明細書に援用され、それら出典を明示して本明細書の一部とみなす。

【0107】

【発明の効果】溶液中の分析物を高密度に集積し、簡便かつ高感度で検出し得る方法、それに用いるデバイス、およびそれを備えた装置が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】ポジ型フォトレジストを用いる、本発明の実施の形態1の概略を示す図。

【図2】ポジ型フォトレジストを用いる、本発明の実施の形態1の改変例の概略を示す図。

【図3】ポジ型フォトレジストを用いる、本発明の実施の形態1の改変例における形状変化した遺伝子センサを示す図。

【図4】ネガ型フォトレジストを用いる、本発明の実施の形態1の概略を示す図。

【図5】ネガ型フォトレジストを用いる、本発明の実施の形態1の改変例の形状変化した遺伝子センサを示す図。

【図6】光硬化性樹脂を用いる、本発明の実施の形態2の概略を示す図。

【図7】塑性変形層を用いる、本発明の実施の形態3の概略を示す図。

【図8】塑性変形層を用いる、本発明の実施の形態3の概略を示す図。

【図9】非弾性変化する層を用いる、本発明の実施の形態4の概略を示す図。

【図10】非弾性変化する層を用いる、本発明の実施の形態4の概略を示す図。

【図11】本発明の自動遺伝子検出装置の概略を示す図。

【符号の説明】

101、601、701、901 基板

102 核酸プローブ（一本鎖）

103 遺伝子核酸サンプル

104 標識物質（遮光物質）

105 フォトレジスト層

106、606、704、904 支持層

108 標識物質（遮光挿入剤）

109 光源

110 光源駆動装置

111 位置検出器

112 AFM駆動装置

113、706 AFM探針

213 二本鎖形成領域

114 支持層形状

115 支持層形状

116 支持層形状

417 ネガ型フォトレジスト

10 418 支持層形状

519 支持層形状

520 支持層形状

604 光硬化性樹脂

605 光硬化を起こす官能基をもつ挿入剤

613 凝集体

705 塑性変形層

707 圧電素子

708 電源

709、909 レーザ光源

20 710、910 レーザ駆動装置

711、911 フォトマル

712、912 位置検出器

905 導電層

906 塑性変形層

907 カンチレバー

908 導電層

913 電圧印加装置

29 洗浄手段

30 核酸解離装置

30 31 サンプル溶液リザーバ

32 反応槽

33 遺伝子センサ

34 温度制御装置

35 移動ステージ

36 カンチレバー

37 基板表面幾何学形状測定装置

38 露光装置／電圧印加装置

39 制御装置

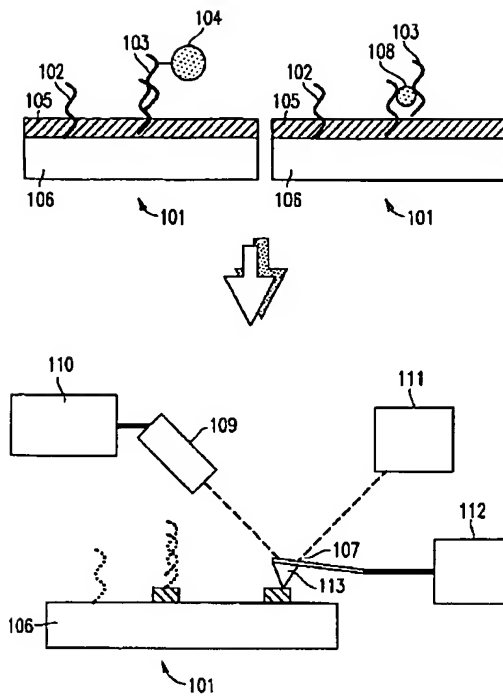
40 移動制御装置

40 41 計算機

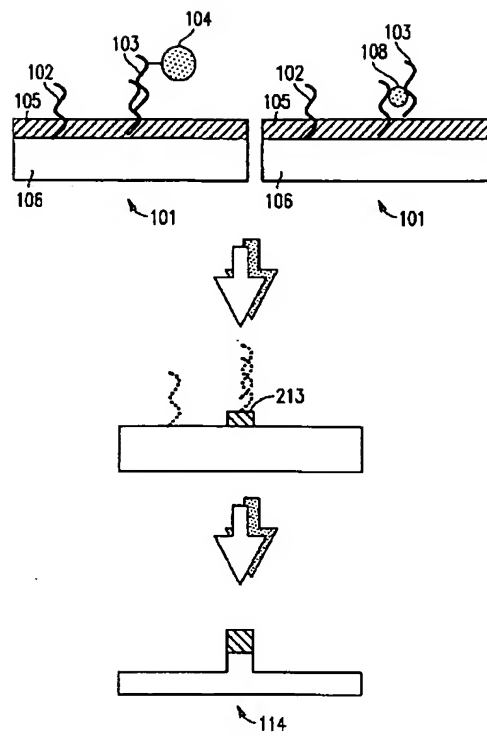
42 標識物質リザーバ

43 遺伝子センサ移動手段

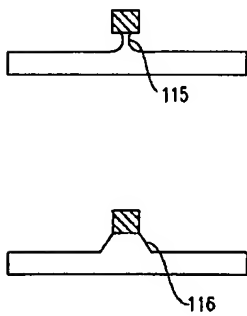
【図1】



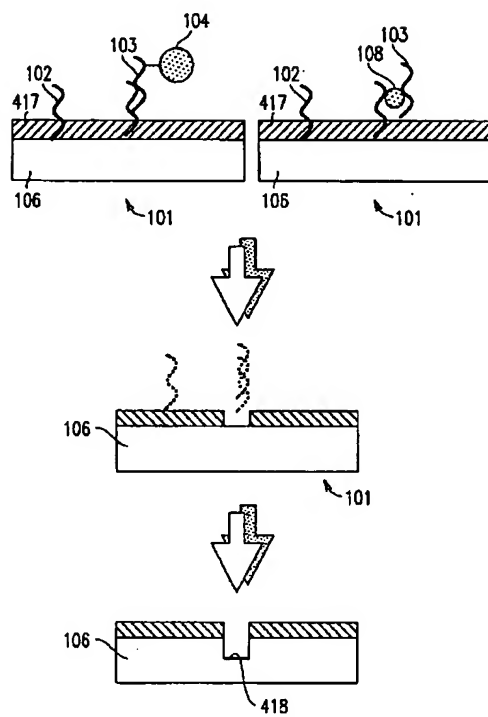
【図2】



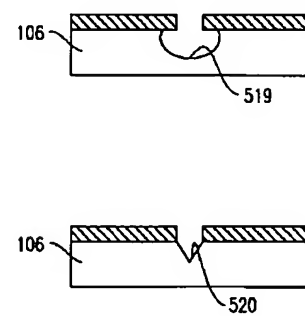
【図3】



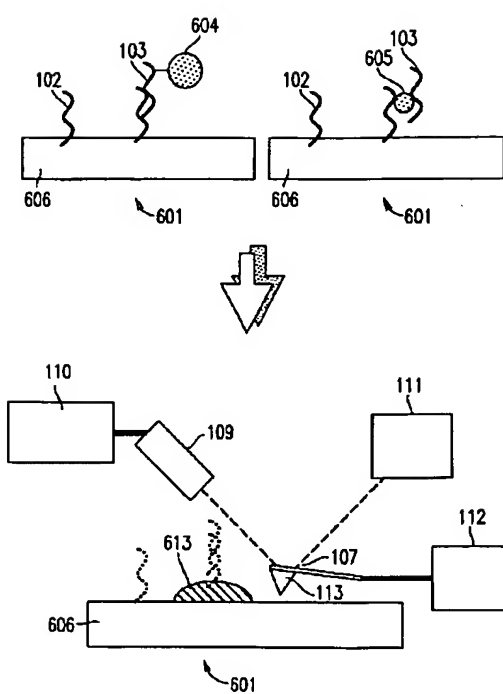
【図4】



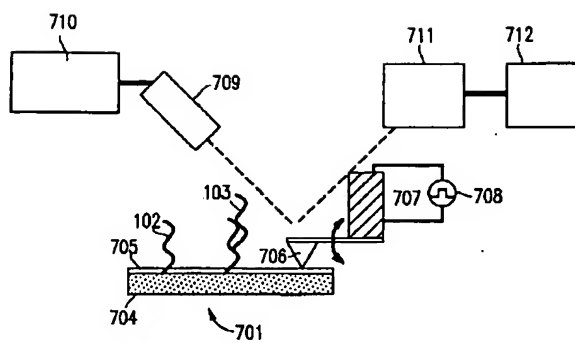
【図5】



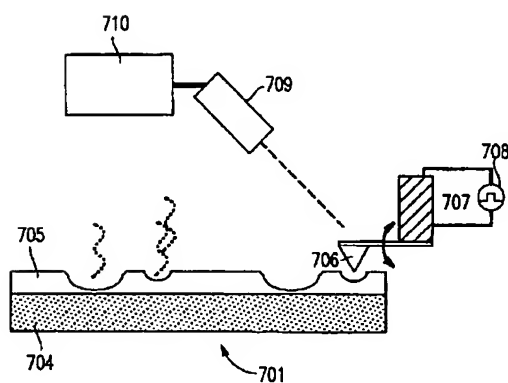
【図6】



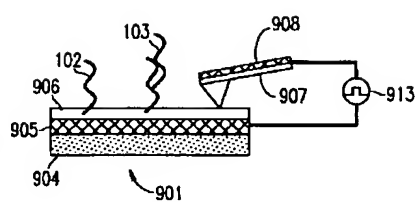
【図7】



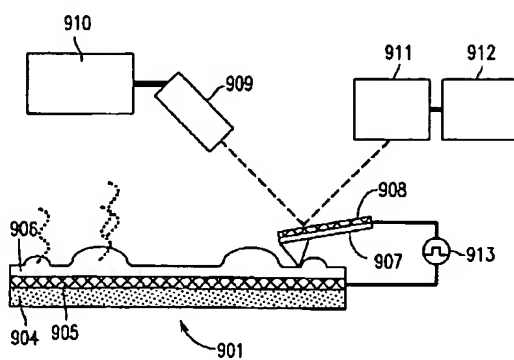
【図8】



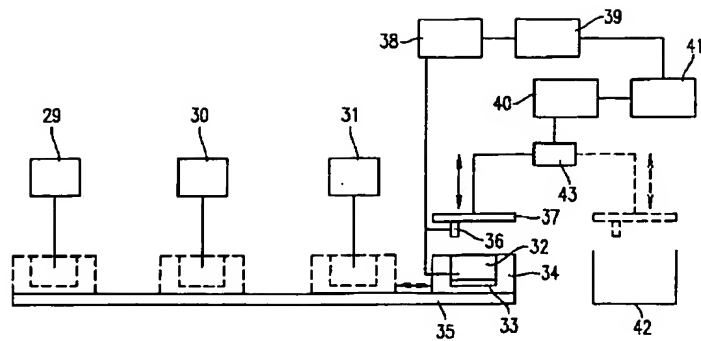
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	キーワード (参考)
G 0 1 N 37/00	1 0 2	G 0 1 N 37/00	1 0 2
// C 1 2 N 15/09		G 0 1 B 21/20	F
G 0 1 B 21/20		G 0 1 N 33/543	5 2 5 C
G 0 1 N 33/543	5 2 5	33/58	A
33/58		C 1 2 N 15/00	F

(72)発明者 行政 哲男
 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
 産業株式会社内
 (72)発明者 杉原 宏和
 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
 産業株式会社内

F ターム (参考) 2F069 AA61 BB40 HH30
 2G045 AA35 DA13 FA11 FA16 FB02
 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 HA14
 HA19
 4B029 AA07 FA12
 4B063 QA01 QA13 QQ42 QR32 QR55
 QR84 QS34 QX01

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.